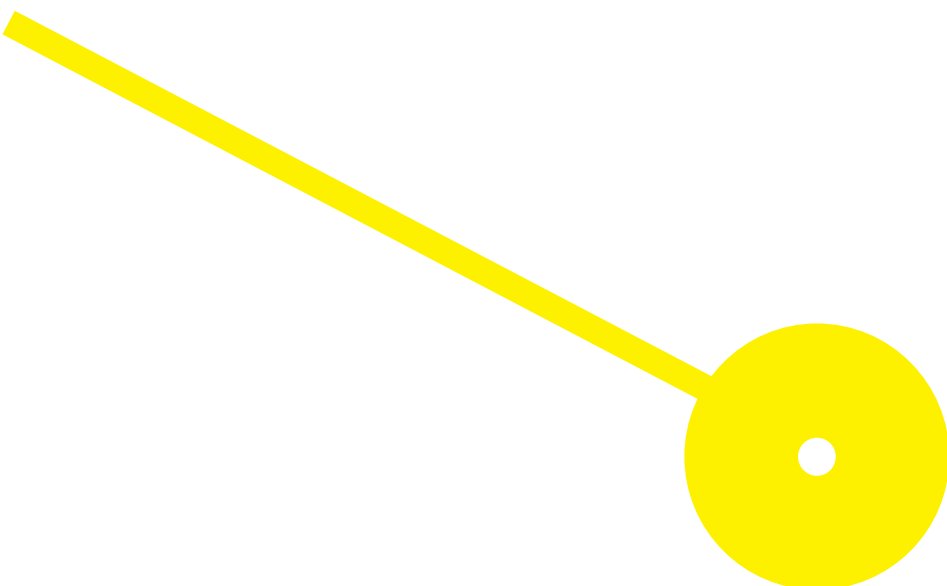




Suplementação de colagénio e o seu impacto no envelhecimento cutâneo - Revisão

Cecília Alexandra Gonçalves Ribeiro Sobrinho

12/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

Suplementação de colagénio e o seu impacto no envelhecimento cutâneo - Revisão

Autor

Cecília Alexandra Gonçalves Ribeiro Sobrinho

Orientadores

Prof.^(a) Doutora Marisa Machado, Escola Superior de Saúde do Vale do Ave do Instituto

Politécnico de Saúde do Norte

Prof.^(a) Doutora Ana Isabel Oliveira, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Fisioterapia Dermatofuncional** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste projeto de investigação e da elaboração da presente dissertação representou para mim um grande desafio, principalmente porque ocorreu num ano tão atípico como este, derivado a esta pandemia, mas mais ainda porque a este fator se juntou o facto de ter sido mãe pela segunda vez. Ao longo deste percurso, existiram muitos momentos de desmotivação e de dúvida na exequibilidade do projeto no tempo proposto. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida.

Tenho de começar por agradecer ao meu marido, Hélder Carvalho, pois sem ele este projeto não seria de todo possível, pela sua paciência e compreensão e por ser um companheiro incondicional em mais um projeto da minha vida. Sem ele, nem sempre os nossos filhos me permitiam trabalhar/pensar.

Também queria agradecer aos meus filhos, que amo incondicionalmente e que são a minha fonte de inspiração, espero doravante compensá-los das horas de atenção e brincadeira que lhes devo.

Um grande agradecimento aos meus pais e à minha irmã por me apoiarem de forma incondicional, por compreenderem a minha ausência e falta de disponibilidade.

A todos os professores do curso de mestrado, pelos conhecimentos e competências que me transmitiram ao longo deste percurso académico, que culminaram na elaboração desta tese em especial às orientadoras Prof. Doutora Marisa Machado e Prof. Doutora Ana Isabel Oliveira por me apoiarem, orientarem e contribuírem para enriquecer, com grande dedicação, passo por passo, todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado na elaboração deste projeto.

Aos meus amigos e todas as pessoas que se cruzam na minha vida, que me desafiam e me inspiram.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Resumo

O uso de suplementos orais como o colagénio para cuidados cutâneos tem aumentado, mas há falta de evidência científica que permita confirmar a sua eficácia no combate às características do envelhecimento cutâneo. Para resolver esta lacuna do conhecimento, estudos clínicos sobre os potenciais efeitos dos suplementos à base de colagénio na pele têm sido desenvolvidos.

Nesta revisão foi efetuada uma pesquisa bibliográfica em diversos motores de busca científicos, recorrendo a uma combinação de termos relacionados com colagénio e envelhecimento cutâneo, com o objetivo de revisar a literatura e avaliar os ensaios clínicos, randomizados, duplo cego, com grupo de controlo, em humanos, disponíveis em inglês e português, que recorrem à suplementação de colagénio, avaliando a sua eficácia no tratamento das características do envelhecimento da pele.

Seis estudos foram incluídos com recurso à suplementação de colagénio hidrolisado e peptídeos de colagénio com doses entre 2,5g/dia a 10g /dia e duração entre 8 a 12 semanas.

Os resultados preliminares são promissores para o uso de suplementos de colagénio oral no combate ao envelhecimento da pele, apresentando melhorias nas rugas, hidratação, elasticidade, textura e estrutura da pele. Mais estudos são necessários para avaliar o uso de suplemento de colagénio no combate ao envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: Colagénio; Colagénio Hidrolisado; Peptídios de Colagénio; Envelhecimento Cutâneo; Suplementação.

Abstract

The use of oral supplements such as collagen for skin care has increased, but there is a lack of scientific evidence to confirm its effectiveness in combating the characteristics of skin aging. To address this knowledge gap, clinical studies on the potential effects of collagen-based supplements on the skin have been developed.

In this review, a bibliographic search was carried out in several scientific search engines, using a combination of terms related to collagen and skin aging, with the aim of reviewing the literature and evaluating randomized, double-blind clinical trials with a control group, in humans, available in English and Portuguese, related to collagen supplementation, and its effectiveness in treating the characteristics of skin aging.

Six studies were included using supplementation of hydrolyzed collagen and collagen peptides with doses between 2.5 g / day to 10 g / day and duration between 8 to 12 weeks.

The preliminary results are promising for the use of oral collagen supplements to combat skin aging, with improvements in wrinkles, hydration, elasticity, texture and skin structure. Further studies are needed to evaluate the use of collagen supplement to combat skin aging.

Keywords: Collagen; Collagen Hidrolysate; Collagen peptides; Skin Aging; Supplementation

Índice

1	Introdução	1
1.2	Envelhecimento Cutâneo	2
1.3	Fontes de colagénio	6
1.4	Síntese colagénio.....	9
1.4.1	Processo de formação do colagénio	9
1.4.2	Sistema imunitário e formação do colagénio	11
1.5	Biodisponibilidade do colagénio	12
1.6	Métodos de avaliação das características cutâneas	13
1.6.1	Elasticidade da pele.....	15
1.6.2	Estrutura da pele	16
1.6.3	Hidratação da pele	17
1.6.4	Rugas da pele	18
2	Objetivos	19
3	Metodologia	19
4	Resultados	19
5	Discussão de resultados	26
6	Conclusões.....	31
7	Limitações	31
8	Referências bibliográficas	32

Índice de Abreviaturas

3D – três dimensões

AGEs – produtos finais de glicação avançada

BSB – biópsias de sucção de bolha

CH – colagénio hidrolisado

DNA- ácido desoxirribonucleico

ERO – espécies reativas de oxigénio

ERN – espécies reativas de nitrogénio

FDA– Food And Drug Adminsitration

H-PC – hidrolisado de colagénio contendo grande quantidade de peptídeos de baixo peso molecular

HF-USG – ultrassonografia de alta frequência

IL-10 – interleucina 10

IR – radiação Infravermelha

L-PC – hidrolisado de colagénio contendo baixa quantidade de peptídeos de baixo peso molecular

LMWCP – peptídeo de colagénio de baixo peso molecular

MMS – metaloproteinases da matriz

mRNA - ácido ribonucleíco mensageiro

NR – não reportado

PC – peptídios de colagénio

Pro-Hyp – prolina-hidroxiprolina

RCM – microscopia confocal de reflectância

TGF- β – fator de crescimento transformador Beta

Treg – T reguladores

tRNA - ácido ribonucleico transportador

TEWL – hidratação da pele e perda de água transepidérmica

UV – radiação ultravioleta

VL – radiação visível

1 Introdução

A preocupação com a qualidade de vida e o envelhecimento precoce tem levado as pessoas a procurarem e a consumirem produtos saudáveis, que possam melhorar as condições de saúde e promover o bem-estar. A melhoria dos hábitos alimentares, a preocupação com a estética e a prevenção do surgimento precoce de doenças degenerativas, por meio da ingestão de uma alimentação saudável, contribuíram para o aumento das pesquisas de caracterização de alimentos e/ou ingredientes que possuam propriedades terapêuticas, além das funções nutricionais normais (1). Uma das principais preocupações estéticas da atualidade é a aparência da pele. A pele é o maior órgão do ser humano, sendo constituída por três camadas: a epiderme, derme e hipoderme. A sua função fisiológica primária é a de uma barreira entre o corpo e o ambiente externo, protegendo contra danos mecânicos, radiações, compostos tóxicos e microrganismos. Desempenha um papel importante na regulação da temperatura corporal e está envolvida na homeostase da água corporal (2).

O colagénio é uma proteína de origem animal, cuja função no organismo é contribuir com a integridade estrutural dos tecidos em que está presente. Este encontra-se no tecido conjuntivo de várias partes do corpo, tais como os ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos. Existem aproximadamente 27 tipos diferentes de colagénio no corpo, sendo o colagénio tipo I o mais abundante. Na pele, o colagénio tipo I e III representam, respetivamente, 85 a 90% e 8 a 11% do colagénio total sintetizado (3). Porém, com o início da fase adulta, a deficiência de colagénio começa a ser notada, pois o organismo diminui a sua produção, sendo sua suplementação uma possível estratégia (4).

Durante o envelhecimento, ocorrem mudanças qualitativas e quantitativas na pele. Perda de elasticidade, redução da espessura da epiderme e do conteúdo de colagénio e aumento de rugas são características do envelhecimento cutâneo (5).

O colagénio é essencial para uma manutenção adequada da saúde da pele. No entanto, tanto o fotoenvelhecimento como o envelhecimento intrínseco, provocam a diminuição dos níveis dessa proteína no organismo, levando a uma perda da elasticidade e hidratação da pele e a uma diminuição da espessura da mesma. Estas devem-se principalmente a alterações estruturais relacionadas com os elementos da pele, originadas pela escassez de fibroblastos, levando a um abrandamento na síntese do colagénio, perdendo este a sua regularidade e aparência flexível (5, 6). A sua suplementação, passa, então, por ser uma possível estratégia (4).

O colagénio é um dos ingredientes com características funcionais mais consumidos na atualidade com a promessa de combater o envelhecimento cutâneo. Em 2016, o tamanho do

mercado global de colagénio foi estimado em US \$ 3,71 bilhões e deve testemunhar um crescimento importante nos próximos anos devendo chegar a US \$ 6,63 bilhões até 2025. Isto é principalmente como resultado da crescente demanda por bebidas e alimentos, cosméticos e cuidados com a saúde (7).

Desta forma, começou a ocorrer um aumento no interesse pela aplicação industrial de colagénio em suplementos alimentares (1). Além disso, nos últimos anos tem surgido uma forte tendência para tratamentos faciais acompanhados de suplementação oral com o objetivo de promover uma melhoria da aparência da pele como um todo. O estudo de Albornoz, Shah (8) refere que desde 2015 ocorreu um aumento do interesse do consumidor, baseado em pesquisas online, em suplementos de colagénio.

Sabendo que uma pele saudável pode ter influência de vários fatores como a ingestão de líquidos, hábitos alimentares, exposição solar, idade, hormonas e uso de suplementação oral, com vitaminas, antioxidantes e outros ingredientes (9), e embora os estudos em humanos tenham demonstrado que a ingestão oral de colagénio hidrolisado leve a um aumento transitório dos níveis de peptídeos derivados de colagénio no sangue, se esses peptídeos atingem a pele ainda não está claro (10).

Nesse contexto, o presente trabalho pretende analisar e demonstrar o conhecimento atual sobre as propriedades funcionais e os possíveis efeitos benéficos cutâneos da suplementação isolada de colagénio.

1.2 Envelhecimento Cutâneo

A exposição ao sol, a poluição, hábitos tabágicos, stress, falta de horas de sono e uma nutrição rica em alimentos processados e pobre em vitaminas e compostos bioativos, são hoje fatores bem conhecidos por desencadear processos moleculares que danificam a estrutura da pele, levando ao seu aspeto envelhecido (Figura 1). Outros fatores menos estudados são reconhecidos como potencializadores do envelhecimento cutâneo, como é o caso dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Foi demonstrado que esses fatores atuam separadamente ou interagindo entre si e potencializando o processo. Todos estes fatores afetam os fibroblastos na derme, causando alterações na sua forma, quantidade e qualidade da produção de elastina e fibras de colagénio tipo I. Além disso, os fibroblastos envelhecidos sintetizam menos colagénio, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando comparados aos fibroblastos de adultos jovens. Isto resulta em sinais visíveis de envelhecimento, que geralmente são mais proeminentes no rosto (11).

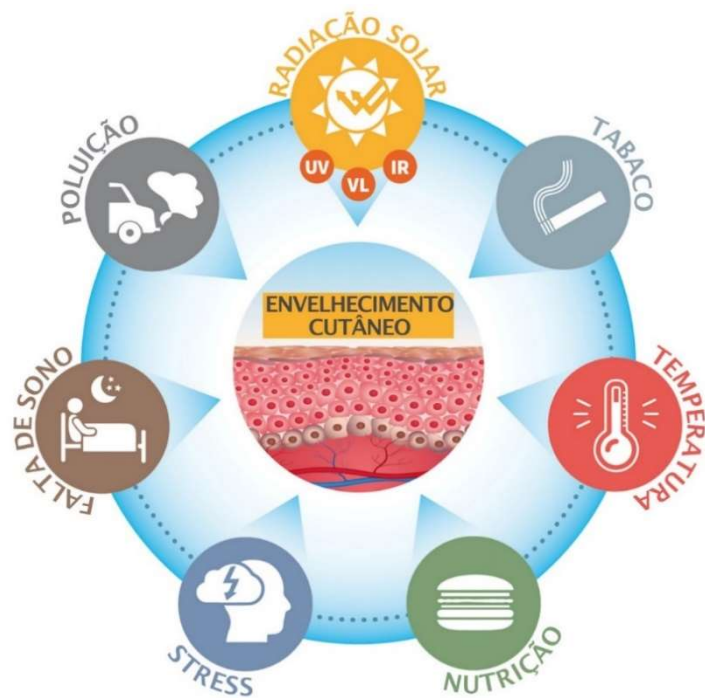


Figura 1 - Fatores de exposição identificados que potenciam o envelhecimento cutâneo.
Adaptado de Krutmann, Bouloc (9).

Legenda:

UV – radiação ultravioleta; VL – radiação visível de comprimento de onda longo, baixa energia; IR – radiação infravermelha

A luz solar, ou o espectro solar é composto por raios eletromagnéticos de diferentes comprimentos de onda, variando de comprimento de onda curto, alta energia, radiação ultravioleta (UVR), luz visível (VL) e raios de comprimento de onda longo, de baixa energia, radiação infravermelha (IR) (Figura 2). A maior parte do espectro solar atinge a pele. O papel da radiação UV no envelhecimento cutâneo está bem estabelecido e o termo fotoenvelhecimento foi criado para enfatizar essa relação de causa e efeito. De facto, inúmeros estudos foram conduzidos durante as últimas décadas para analisar os mecanismos subjacentes e, com base nesse conhecimento, desenvolveram estratégias para prevenir ou pelo menos retardar o fotoenvelhecimento cutâneo. Há muito que se considera que a VL e a IR têm um impacto mínimo na pele, além da sensação de calor fornecida pela IR. A luz visível e a radiação infravermelha foram inicialmente relatadas como indutoras da produção de enzimas degradantes da matriz e, consequentemente, a diminuição da produção de colagénio (9).

O fotoenvelhecimento promove na derme alterações nas fibras de colagénio e elastina promovendo uma desorganização de natureza anormal. A exposição crónica à luz solar também pode causar queratose actínica (espessamento do estrato córneo), acantose (aumento do número de células no estrato espinhoso da epiderme), ectasia vascular (aumento dos vasos) e inflamação geral da pele. No processo de envelhecimento, também é observado uma

acumulação de dano oxidativo nas células e tecidos. Isso é causado por um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes naturais. Na pele, os danos causados pelos radicais livres podem causar deterioração do estrato córneo e do tecido conjuntivo de suporte, resultando em menor elasticidade e resiliência. Os danos causados pelo sol, aumentando a produção de EROs, podem causar cancro de pele e fotoenvelhecimento e podem gerar rugas, descamação, ressecamento e pigmentação (12).

A relação entre o tabagismo e o envelhecimento cutâneo é apoiada em estudos epidemiológicos e evidências mecanísticas *in vitro*. A pele de fumadores tem sido caracterizada por rugas faciais proeminentes, particularmente ao redor da boca e lábio superior e olhos (13). Descobriu-se que fumadores com elevado consumo têm hiperpigmentação da mucosa oral, chamada de "melanose do fumador". Alterações de pigmentação facial também podem ocorrer (14).

Uma relação entre a poluição do ar e o envelhecimento cutâneo foi primeiro demonstrada no estudo SALIA, um estudo epidemiológico em mulheres idosas caucasianas, que indicou que a exposição a partículas transportadas pelo ar relacionados ao tráfego rodoviário, contribui para o envelhecimento cutâneo (15). Outros estudos transversais foram realizados, onde a poluição rural e urbana está particularmente presente, fornecendo evidências epidemiológicas adicionais para a relação entre o contato com combustível fóssil e o envelhecimento cutâneo (9).

O stress também parece afetar a integridade do colagénio na pele. O stress crónico estimula o sistema nervoso autónomo, o sistema renina-angiotensina e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Esta ativação prolongada pode resultar numa disfunção imunológica crónica, aumento da produção de EROs e danos no Ácido desoxirribonucleico (DNA), que são contribuintes conhecidos para o envelhecimento cutâneo, embora os mecanismos subjacentes ainda não tenham sido claramente definidos (16, 17).

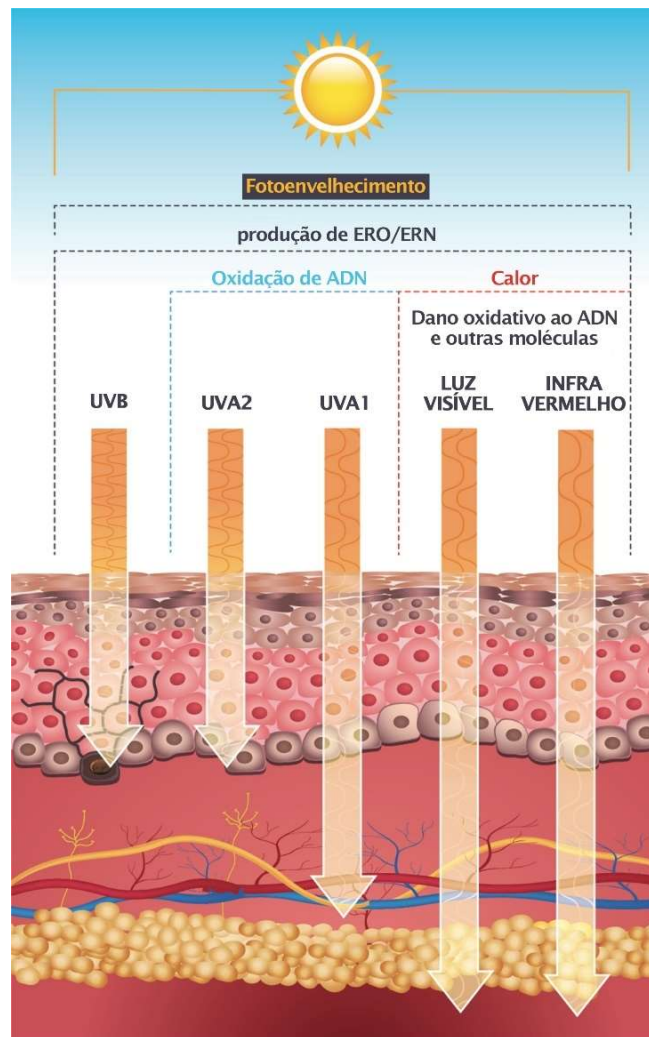


Figura 2 – Mecanismos que promovem fotoenvelhecimento cutâneo. Adaptado de Krutmann, Bouloc (9).

Legenda:

UVB – ultravioleta B; UVA – ultravioleta A; ERO – espécies reativas de oxigênio; ERN – espécies reativas de nitrogênio

A principal característica do envelhecimento cutâneo é a fragmentação da matriz de colagénio na derme por ação de enzimas específicas, tal como as metaloproteinases da matriz (MMS). Os fibroblastos que produzem e organizam a matriz de colagénio não podem inserir o colagénio fragmentado. A perda da inserção do colagénio, ou seja, a menor produção de colagénio impede que os fibroblastos recebam informações mecânicas, ocorrendo o desequilíbrio entre a produção de colagénio e a ação de enzimas que o degradam. Na pele envelhecida, há uma menor produção de colagénio pelos fibroblastos, tal como referido anteriormente, uma maior ação das enzimas que o degradam e este desequilíbrio promove o processo de envelhecimento. Algumas estratégias comprovadas clinicamente são usadas para estimularem a produção de novo colagénio não fragmentado, como o ácido retinóico, laser, tratamentos com dióxido de carbono e injeção intradérmicas de ácido hialurónico. Esses

tratamentos promovem o equilíbrio entre a produção de colagénio e a ação das enzimas que o degradam, retardando o processo de envelhecimento e, conseqüentemente, melhoram a aparência e a saúde da pele (1).

Dos fatores menos estudados, mas que parecem influenciar também o envelhecimento cutâneo é o desenvolvimento de AGEs, promovidos por níveis elevados de glicose no sangue contribuindo para a produção de uma reação química entre a glicose e os grupos amino livres nas proteínas. Os AGEs permanecem no tecido onde se formam porque não podem ser degradados normalmente por enzimas. A formação de AGEs é espontânea e bastante lenta, afetando apenas proteínas com meia-vida relativamente longa e que contêm resíduos de lisina expostos. Nesse aspecto, os colagénios fibrilares são altamente suscetíveis à glicação. Embora a meia-vida do colagénio varie entre os tecidos, ela permanece consideravelmente longa, variando de 1-2 anos para o colagénio tipo I no osso, a 10-15 anos na pele e mais de 100 anos para o colagénio tipo II na cartilagem.

Bioquimicamente, a reação de glicação inicia com a formação de uma base de Schiff reversível entre um hidrato de carbono, tipicamente glicose ou ribose, e um grupo amino de proteína (por exemplo, uma cadeia lateral de lisina). A base de Schiff instável torna-se um intermediário cetoamina estável, geralmente referido como produto Amadori. Ao longo de meses ou anos, uma série complexa de reações pode eventualmente levar à formação de vários AGEs, que podem ser resultados de proteínas ou ligações cruzadas. Recentemente, foi descoberto que entre todos os diferentes AGEs em tecidos humanos, o mais abundante é o glucosепano, um cruzamento de lisina-arginina (18).

1.3 Fontes de colagénio

As fontes de colagénio podem ser animais e vegetais. As fontes de origem animal mais comuns são as de bovino, suíno, ovino e de organismos marinhos (escamas e pele de peixe). Entre essas fontes animais, o colagénio bovino é o mais usado como cobertura temporária para feridas extra-orais e também para as queimaduras no corpo. Tem grandes aplicações devido à sua utilidade e biocompatibilidade. As matrizes de colagénio suíno, ao contrário, têm o potencial de serem úteis para enxerto de tecidos moles, sendo um material cirúrgico biocompatível como alternativa ao transplante autógeno. Outras fontes provenientes de animais terrestre incluem o frango, a cauda de canguru, os tendões da cauda de rato, pés de pato, tendão de equino, ossos/pele de crocodilo, pés de pássaro, pele de carneiro e pele de rã. Os tipos I e II vêm da pele, cartilagem e flexores de equinos. Os tipos I, II, III e V vêm do pescoço de frango. O tipo IX é encontrado na cartilagem esternal do embrião de galinha, I e III na pele e IV no tecido muscular. As fontes mencionadas são baratas e fáceis de adquirir, mas após o uso prolongado e a

caracterização concreta, o colagénio dessas fontes tende a ser alergénico provocando diversas doenças como a osteogénese imperfeita. Como solução para esse problema, algumas modificações foram feitas na molécula de colagénio e também novas fontes foram procuradas. Assim, outra fonte natural viável é o colagénio marinho. Foi demonstrado que não tem risco de transmissão de doenças, sendo considerado como “geralmente reconhecido como seguro” pela FDA (Food and Drug Administration) e também é uma matéria-prima de produção barata, porque muitas das partes do corpo de onde provém acabam como desperdício de consumo humano. Algumas das fontes mais comuns de colagénio estão descritas na Tabela 1 (7).

Tabela 1 - Tipos de colagénio e usos na indústria ou funções no corpo humano. Adaptado de Avila Rodriguez, Rodriguez Barroso (7)

Família	Tipo	Distribuição nos tecidos	Aplicações/Funções
Formador de fibrila	I	Tendão, ligamentos, osso e córnea	Membranas para regeneração de tecidos
	II	Pulmão, córnea, fibras reticulares, cartilagem, parede do vaso sanguíneo, núcleo pulposo, osso, corpo vítreo e pele	Reparo da cartilagem e tratamento da artrite
	III		Hemostatos e selantes de tecido
	V		Matéria-prima para biomaterial em tratamentos da córnea
	XI	Corpo vítreo e cartilagem	Desenvolvimento de anticorpos monoclonais para osteoartrite
Membrana basal	IV	Membrana basal	Potenciador de fixação de cultura de células (neuroblastoma de camundongo) e indicador de nefropatia diabética
Microfibrilar	VI	Derme, placenta, pulmões, cartilagem, disco intervertebral e placenta.	Hemostato
Ancoragem	VII	Muco oral, colo do útero, junções dérmica e epidérmica e pele	Injeção subdérmica como tratamento para epidermólise bolhosa distrófica
FACIT*	IX	Córnea, cartilagem e humor vítreo	É distribuído com o colagénio tipo II na cartilagem e no corpo vítreo
	XII	Tendão, pericôndrio e ligamentos	Associado às fibrilas contendo colagénio I.O colagénio XIV também é um regulador do diâmetro da fibrila nos estágios iniciais da fibrilogénese
	XIV	Parede do vaso sanguíneo, placenta, fígado, derme e pulmões	Localizados na zona da membrana basal e apresentam propriedades antiangiogénicas e antitumorais
	XIX	Rabdomiossarcoma humano	Semelhante aos tipos de colagénio XII e XIV. A função desse colagénio é relativamente desconhecida.
	XX	Pele embrionária, tendão, epitélio córneo e cartilagem esternal.	Intimamente relacionado aos colagénios XII, XIV e XX. A sua expressão é estimulada pelo fator de crescimento derivado de plaquetas, o que indica que esse colagénio pode contribuir para a montagem da matriz da rede vascular durante a formação dos vasos sanguíneos.
	XXI	Parede do vaso sanguíneo	
Transmembranar	XIII	Folículo piloso, intestino, fígado, junções dérmicas e epidérmicas, epiderme e pulmões	Afeta a formação óssea e pode ter uma função no acoplamento da regulação da massa óssea ao uso mecânico. Envolvido na inflamação e vasculogénese

	XVII	Junções dérmicas e epidérmicas	Sua função hipotética é estabilizar a adesão das células epiteliais à matriz extracelular circundante. Tem papel importante na formação dos dentes
Multiplexins**	XV	Rim, células musculares lisas, fibroblastos e pâncreas.	Ele forma uma ponte ligando fibrilas grandes em faixas, provavelmente fibrilas contendo colagénios I e III.
	XVI	Queratinócitos e fibroblastos	Como está implicado em várias doenças, pode ser possivelmente usado como um alvo de drogas ou biomarcador
	XVIII	Fígado e pulmões	Ele tem um papel importante na determinação da estrutura da retina e no fechamento do tubo neural

*colagénios associados com fibrila com tripla hélice interrompida ou colagénio FACIT

** múltiplos domínios de hélice tripla com interrupções

A extração de colagénio inicia-se pela desnaturação da molécula nativa através de tratamento térmico acima de 40 °C, produzindo três cadeias α na sua forma enrolada (Figura 3). Uma vez separadas as cadeias, a hidrólise é realizada pela ação de enzimas proteolíticas (alcalase, papaína, pepsina e outras). O produto resultante é comumente chamado de CH. Isto é composto de pequenos peptídeos com baixo peso molecular 3-6 KDa e a sua solubilidade e atividade funcional (antioxidante, antimicrobiana) estão relacionadas ao tipo e grau de hidrólise, bem como ao tipo de enzima usada no processo. Outro tipo de hidrólise é pelo uso de produtos químicos em meio ácido (ácido acético, ácido clorídrico e ácido fosfórico) ou alcalino. Esses dois tipos de extração são fortemente corrosivos e produzem uma alta concentração de sal no produto final após a neutralização. Métodos alternativos de extração consistem em tratamento térmico ou aplicação de alta temperatura e pressão à proteína (19)

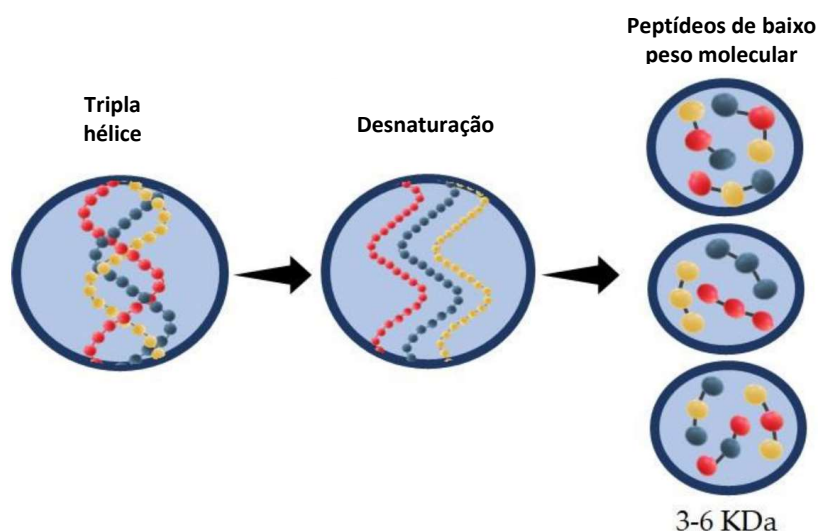


Figura 3 – Processo de desnaturação do colagénio nativo em peptídeos de baixo peso molecular. Adaptado de Leon-Lopez, Morales-Penaloza (19).

1.4 Síntese colagénio

1.4.1 Processo de formação do colagénio

O termo “colagénio” é utilizado para denominar uma família de 27 isoformas de proteínas encontradas nos tecidos conjuntivos do corpo. Em termos de quantidade, é o composto mais importante do tecido conjuntivo e é um elemento estrutural importante em organismos multicelulares. O colagénio é uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal, contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias são organizadas de forma paralela a um eixo, formando as fibras de colagénio, que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura presente. As proteínas colagenosas formam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes), sozinhas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares (Figura 3). A sua principal função é contribuir para a integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz. O colagénio apresenta propriedades mecânicas singulares e é quimicamente inerte (20).

A molécula de colagénio tem 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300.000 Da, estabilizada por pontes de hidrogénio e por ligações intermoleculares. A sequência de aminoácidos do colagénio é, em geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão. Cada molécula de colagénio pode ter até três cadeias diferentes, que se unem na formação do procolagénio (21)

O processo de formação do colagénio ocorre principalmente durante o início da regeneração e do desenvolvimento do tecido embrionário. As moléculas de colagénio são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolagénio solúvel, que é ladeado por duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogénio (N-) e carbono (C-) terminais. O procolagénio é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, em sequência, é secretado para a matriz extracelular. Na matriz extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas estruturas globulares ligadas às extremidades do procolagénio. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogénese (produção de colagénio), pois essas estruturas globulares ligadas ao procolagénio ocupam um grande espaço em volta da molécula. Assim, é necessário que ocorra o processo de clivagem para formação do tropocolagénio, que começa a unir-se com outras moléculas de tropocolagénio, formando as fibrilas (20, 21).

As ligações peptídicas estão presentes nas formações das ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias, resultado da interação entre os grupos aldeídos e grupos amino livres. Essas ligações cruzadas fornecem a estabilidade e a força tensora necessária à estrutura supramolecular. O enrolamento da tripla hélice fornece uma grande resistência às

forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento. Assim, o colagénio apresenta uma resistência mecânica que é aumentada pelo enrolamento helicoidal de múltiplos segmentos numa super-hélice, de uma forma muito parecida a cordões enrolados entre si e sobre si mesmo, para formar uma corda mais resistente. Os aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, presentes na estrutura do colagénio, não são sintetizados, mas são formados por hidroxilação da prolina e lisina, respetivamente, que se inicia nos ribossomas durante a tradução do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) do colagénio. Assim, o processo de hidroxilação é concluído após a formação da estrutura linear. As fibrilas de colagénio são compostas de agregados de moléculas de colagénio ao longo de um eixo paralelo, mas cujas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm (20, 21).

O colagénio apresenta estrutura molecular relativamente simples e é insolúvel em água, em virtude da grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, quer no interior da proteína, quer na superfície (Figura 3) (1).

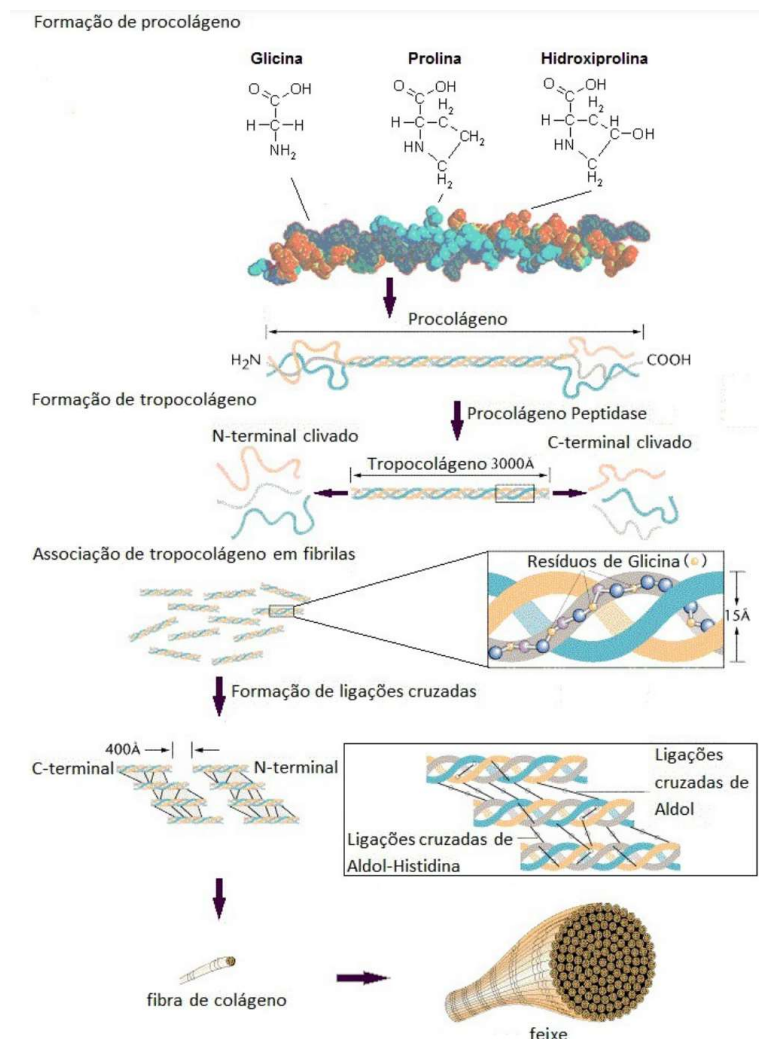


Figura 3 - Processo de formação, organização e estrutura de colagénio. Adaptado de Silva and Pena (1)

Incorporados na rede de fibras de colagénio estão os glucosaminoglicanos, compostos principalmente de ácido hialurónico e sulfato de dermatana. O tamanho molecular do ácido hialurónico é bastante importante, pois afeta as propriedades físico-químicas da pele, como sua capacidade de reter água, a sua elasticidade e viscosidade. O ácido hialurónico consiste numa cadeia helicoidal que compreende unidades alternadas de N-acetilglucosamina e ácido glucurónico, e o seu peso molecular médio mostrou estar na faixa de 10-104 kDa (22).

1.4.2 Sistema imunitário e formação do colagénio

À primeira vista, parece que os fragmentos de colagénio atuam como precursores para a síntese de colagénio. Mas a síntese de proteínas tem os seus mecanismos específicos e não necessita de nenhum *primer* para o seu início. Além disso, durante a síntese de proteínas, os ácidos ribonucleicos transportadores (tRNAs) têm um papel fundamental na preparação de aminoácidos específicos para a síntese de proteínas. Os tRNAs carregam apenas os aminoácidos e não os peptídeos. Desta forma o mecanismo possível para a associação do colagénio intacto ou hidrolisado com parâmetros de saúde da pele deveria de ser rejeitado, porque nem os peptídeos endógenos nem os exógenos podem participar diretamente do processo de tradução da proteína. Embora os fragmentos de colagénio não possam estar envolvidos diretamente na síntese de proteínas, estudos recentes mostraram que eles podem afetar o metabolismo da matriz extracelular (23). Assim os peptídios de colagénio (PC) aumentam a renovação da pele por indução de linfócitos T Reguladores (Treg) e macrófagos M2. Nos processos de remodelação de tecidos, a remoção adequada e a manipulação de estruturas de colagénio mais antigas são fundamentais. No entanto, ainda existem muitos aspetos desconhecidos no turnover desses componentes abundantes da matriz extracelular *in vivo* (24). Além disso, foi demonstrado que macrófagos do tipo M2 têm um papel fundamental na renovação da matriz extracelular e remodelação (25). Parece também existir algumas evidências sobre o papel significativo da interação Tregs / macrófago na modulação das respostas imunes do hospedeiro, sendo que a depleção de Treg causa a amplificação da ativação de macrófagos. Esses macrófagos têm papel imunomodulador e foi sugerido que na presença de duas citocinas, incluindo interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), as principais citocinas correlacionadas com a função Treg, apresentam um fenótipo regulador. Macrófagos M2 estimulados por IL-10 e secreção de ornitina, aumentam também a produção de matriz extracelular por fibroblastos (23).

A administração oral de colagénio hidrolisado (CH) e colagénio intacto estão estreitamente relacionados à indução de Tregs, e os mecanismos exatos têm sido amplamente demonstrados na última década. Dois mecanismos principais são apresentados para a indução de Tregs mediados por colagénio:

- A. mecanismos mediados por tolerância
- B. mecanismos mediados por não tolerância.

A tolerância oral é um tipo de tolerância periférica em que ocorre a falta de resposta imunológica sistémica aos antígenos alimentares. A indução de Tregs é o principal mecanismo de tolerância oral. Durante os processos de digestão e absorção, o sistema imunológico intestinal colhe amostras do conteúdo do lúmen intestinal continuamente e avalia os antígenos alimentares. Depois de identificar os antígenos derivados de alimentos, a resposta imune contra eles é suprimida (26). Portanto, após a administração oral de colagénio, especialmente colagénio intacto, colónias de Tregs específicas são formadas e suprimem a resposta imune contra o colagénio em qualquer local do corpo. Deve-se observar que, nesse tipo de mecanismo, as proteínas não são necessariamente absorvidas e apenas a amostragem do conteúdo proteico pelo sistema imunológico intestinal poderia induzir a formação de colónias Treg (27).

O mecanismo mediado por não tolerância apresenta até a data evidências mais limitadas. Quando as proteínas da dieta entram no intestino, a digestão começa. Durante a digestão das proteínas dietéticas, aminoácidos livres, di-, tri- e tetra-peptídeos (as principais estruturas derivadas de proteínas absorvíveis) são formados. Di- e tri-peptídeos derivados do colagénio dietético são os principais atores deste mecanismo (28), como demonstrado no estudo de Nishikimi, Koyama (29) onde dipeptídeos contendo hidroxilprolina, Pro-Hyp e Hyp-Gly, promoveram a expansão de Treg em resposta à estimulação do antígeno na presença de TGF- β .

1.5 Biodisponibilidade do colagénio

A biodisponibilidade é definida aqui pela quantidade relativa de um bioativo alimentar consumido que atravessa a barreira intestinal, atinge a circulação sanguínea e está disponível para processos metabólicos ou armazenamento no corpo; neste contexto, a pele (30).

A biodisponibilidade compreende várias etapas resumidas pelo acrónimo “LADME”. “L” significa libertação da molécula da matriz dietética (alimento ou suplemento); “A” significa absorção, isto é, transferência da molécula do lúmen intestinal para a circulação sanguínea; “D” refere-se à distribuição da molécula da circulação sanguínea para todos os tecidos do corpo (neste caso, a pele); “M” leva em consideração o metabolismo, que consiste no processamento

posterior da molécula no corpo, seja no trato gastrointestinal ou em vários tecidos; e “E” refere-se à eliminação pelo corpo na urina, fezes, suor, lágrimas ou ar expirado (2).

A digestão consiste na degradação de colagénio hidrolisado (pequenos peptídeos de colagénio com baixo peso molecular 0,3–8 kDa) para formar dipeptídeos e tripeptídeos ou aminoácidos livres. Várias proteases (como, por exemplo, proteases pancreáticas, proteases do intestino delgado, peptidase) estão envolvidas no processo de degradação (16).

Particularmente interessante sob o ponto de vista de administração é o colagénio hidrolisado líquido ou peptídeos de colagénio (onde o colagénio é hidrolisado em di- e tripeptídeos), visto que o colagénio nesta forma é considerado mais facilmente absorvido. O colagénio hidrolisado pode ser absorvido sistemicamente e distribuído em diferentes tecidos, incluindo a pele (31). Estudos em animais, usando peptídeos de colagénio marcados radioactivamente, demonstraram que os peptídeos absorvidos atingem a pele (32). Embora estudos humanos tenham demonstrado que a ingestão oral de colagénio hidrolisado leva a um aumento transitório dos níveis de peptídeos derivados de colagénio no sangue, se esses peptídeos atingem a pele ainda não está claro (10).

Num ensaio clínico Iwai, Hasegawa (33) demonstrou que uma quantidade significativa de colagénio hidrolisado derivado da hidroxiprolina apareceu no sangue de voluntários humanos saudáveis que consumiram colagénio hidrolisado (de cartilagem, pés de galinha e pele de suíno) após 12 horas de jejum. Após a ingestão de colagénio, a quantidade de peptídeos contendo hidroxiprolina no sangue aumentou, atingindo um pico após 2 horas, seguido por uma redução para metade do nível máximo 4 horas após a ingestão. Um pequeno peptídeo, prolina-hidroxiprolina (Pro-Hyp), também foi encontrado no sangue após a ingestão de colagénio hidrolisado. Verificou-se que a quantidade de Pro-Hyp presente no plasma humano foi de 25-60 nmol / ml após a ingestão 9,4-23 g de colagénio hidrolisado. Os níveis mais elevados de Pro-Hyp encontrados no sangue pode ser parcialmente explicado pela maior quantidade da sequência do Pro-Hyp no colagénio.

1.6 Métodos de avaliação das características cutâneas

A biometria cutânea pode ser definida como o estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele, por meio de medição objetiva e rigorosa de variáveis, usando métodos cientificamente comprovados e preferencialmente não invasivos. Já são bastante empregues, na atualidade, na avaliação do efeito de diferentes formulações, já que possibilita a avaliação *in situ*, neste caso, na pele, dos produtos e sua implicação na saúde cutânea (34). Os métodos utilizados nos ensaios clínicos que fazem parte desta revisão, serão explorados neste

capítulo com o objetivo de os contextualizar, permitindo assegurar os resultados apresentados pelos diversos autores, e encontram-se resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Métodos de avaliação das características cutâneas aplicados nos ensaios clínicos

Parâmetro em avaliação	Instrumentação	Direto/Indireto	Método
Elasticidade pele	• Cutometer®	• Indireto	• Viscoelasticidade e elasticidade biológica – características avaliadas através da medição do Cutometer®, baseado no método de sucção, onde a pressão negativa deforma mecanicamente a pele numa unidade de tempo.
Estrutura da pele	• Dermcup®	• Indireto	• Ultrassonografia de alta frequência - permite a visualização da epiderme, derme e hipoderme, sendo possível uma avaliação precisa da espessura e densidade da pele, bem como avaliação de edema, fibrose e atrofia da pele.
	• Vivascope 3000®	• Indireto	• Microscopia confocal de reflectância – método que utiliza um laser de diodo de alta resolução, não invasivo e seguro, que permite visualizar a um nível celular a epiderme, junção dermoepidérmica e derme papilar da pele.
	• Biópsia de sucção de bolha	• Direto	• Biópsias de sucção de bolha – através da aplicação de vácuo é possível avaliar a separação dermoepidérmica padronizada permitindo também a avaliação do tempo de formação de bolhas, assim como a avaliação do conteúdo dos fluidos provenientes da pele
Hidratação da pele	• Corneometer®	• Indireto	• Capacitância de alta frequência – a diferença entre a constante dielétrica da água e outras substâncias medindo a capacitância de um dielétrico médio, correlacionam-se diretamente com o teor de água da pele
	• DermaLab® • Tewameter®	• Indireto	• TEWL* – é a quantidade de água condensada que se difunde através de uma área fixa do estrato córneo até a superfície da pele por unidade de tempo
Ruga/ Textura da pele	• PRIMOS 3D® • Visiometer® • VisioFace SSA®	• Indireto	• Topografia da superfície da pele – Avalia o micro-relevo poligonal com sulcos e rugas que representam a organização tridimensional da epiderme, a derme e do tecido subcutâneo

*Perda de água transepidérmica

As alterações na condição da pele podem ser avaliadas por meio de medidas subjetivas dos próprios participantes dos estudos (normalmente capturadas por questionários de autorrelato) ou por inspeção visual de um dermatologista. Estes métodos são subjetivos e não podem ser classificados de forma exata a nível quantitativo. A condição da pele também pode ser medida de forma mais objetiva usando equipamentos especializados não invasivos. A sensibilidade das diferentes medidas (ou seja, capacidade de detetar pequenas mudanças), a

magnitude da mudança que seria considerada visivelmente significativa para o consumidor e quantos participantes seriam necessários para dar poder suficiente para detetar essa mudança também são considerações importantes. As técnicas utilizadas para avaliar o envelhecimento da pele podem ser divididas em métodos diretos (incluindo classificação clínica sistemas e medições mecânicas) e métodos indiretos (incluindo impressão de silicone e análise de software de computador). Quaisquer mudanças bioquímicas que ocorreram na pele durante o curso de uma intervenção pode ser verificada por meio da colheita de biópsias de pele ou fluido cutâneo, obtido através de bolhas de sucção (11).

Nos estudos que possuem o objetivo de avaliar os efeitos de suplementos, tratamentos ou produtos cosméticos nas características cutâneas relacionadas com o envelhecimento, os investigadores normalmente definem a avaliação dos 4 seguintes parâmetros (35):

- Elasticidade
- Estrutura
- Hidratação
- Rugas

1.6.1 Elasticidade da pele

As propriedades mecânicas da pele, nomeadamente elasticidade e a plasticidade, são determinadas pela hipoderme, derme e epiderme. Na derme, a elasticidade da pele é uma propriedade mecânica que é parcialmente influenciada pela elastina, uma proteína na derme que, juntamente com o colagénio e os glucosaminoglicanos, formam o tecido conjuntivo. As propriedades físicas da pele são garantidas pela perfeita interação entre esses componentes. A pele humana funciona como um material viscoelástico, onde exhibe comportamento de tensão não linear, dependente do tempo, durante a aplicação da força usada. Na pele jovem, a pele retorna mais rapidamente à sua posição original do que a pele envelhecida. A sua avaliação é complexa e vários métodos têm vindo a ser usados para avaliar estas propriedades. A resistência da pele à sucção (viscoelasticidade) e a capacidade da pele de retornar à sua posição original (elasticidade biológica) podem ser medidas usando o Cutometer®, sendo este o método/instrumento mais usado nesta avaliação (36).

O princípio de medição do Cutometer® é baseado no método de sucção, onde a pressão negativa deforma mecanicamente a pele. A pressão é criada no instrumento e puxa a pele para a abertura da sonda e após um tempo definido, liberta-a novamente. No interior da sonda, a profundidade de penetração é determinada por um sistema de medição ótica sem contacto. A resistência da pele à pressão negativa (firmeza) e sua capacidade de retornar à sua posição original (elasticidade) são apresentadas como curvas (profundidade de penetração em mm /

tempo) em tempo real durante a medição. A partir dessas curvas, uma variedade de parâmetros de medição pode ser calculados relacionados com as propriedades elásticas e viscoelásticas da superfície da pele e do envelhecimento cutâneo (37). As medidas recolhidas incluem extensibilidade da pele (U_e), distensão retardada (U_v), deformação final (U_f) e retração imediata (U_r). Proporções também são relatadas. A relação U_r / U_e , ou elasticidade líquida, é a mais comumente usada (38).

1.6.2 Estrutura da pele

Diversos métodos podem ser utilizados para avaliar a estrutura da pele, podendo estes ser mais ou menos invasivos para o avaliado (39). O ultrassom de alta frequência (HF-USG) permite a visualização da epiderme, derme e hipoderme, sendo possível uma avaliação precisa da espessura e densidade da pele, bem como avaliação de edema, fibrose e atrofia da pele (40). A era dos ultrassons na dermatologia começou em 1979, quando foi introduzido o uso pioneiro de uma frequência de 15 MHz por Alexander and Miller, na medição da espessura da pele. Desde então, algumas novas aplicações da ecografia por ultrassons de alta frequência surgiram, proporcionando aos médicos uma mais valia na sua prática diária. As principais vantagens da HF-USG incluem a possibilidade de imagens em tempo real, mensuração dos aspetos morfológicos e fisiológicos da pele, segurança associada ao uso de meios não ionizantes e também a ausência de contraindicações ao seu desempenho (41). O equipamento também pode quantificar e qualificar as fibras de colagénio e elastina na pele. O método de avaliação da superfície da pele avalia a textura, descamação, suavidade e rugas usando uma câmara e software específico (39).

Outro método indireto de avaliação é a microscopia confocal de reflectância (RCM), que é uma tecnologia aprovada que utiliza um laser de diodo de alta resolução, não invasivo e seguro que permite visualizar a um nível celular a epiderme, junção dermoepidérmica e derme papilar da pele (42).

As biópsias de sucção de bolha (BSB) com avaliação fluidos corporais permitem a colheita de células e fluidos diretamente da pele. A técnica de elevação BSB por vácuo é uma ferramenta bastante conhecida dentro da área da dermatologia para o estudo da imunologia da pele na saúde e na doença (43). O envelhecimento cutâneo está associado ao achatamento da junção dermoepidérmica e a um sistema de ancoragem menos eficaz, predispondo à formação de bolhas, trauma e lesões por cisalhamento. A técnica da sucção de bolha é caracterizada por ser uma técnica controlada de separação dermoepidérmica padronizada permitindo também a avaliação do tempo de formação de bolhas (44). Embora seja um método mais invasivo que o

HF-USG, é uma alternativa interessante às biopsias cutâneas, que promovem lesões mais profundas e menos toleráveis pelos avaliados (45).

1.6.3 Hidratação da pele

Diversos métodos podem ser utilizados para avaliar o estado de hidratação da pele, alguns baseiam-se nas propriedades elétricas da pele para avaliar o estado de hidratação do estrato córneo ou capacidade de retenção de água outros avaliam a perda de água transepidermica (TEWL) de forma a avaliar a integridade da barreira da pele (46). A medição do estado de hidratação do estrato córneo é fator importante na investigação da saúde da pele saudável, bem como na avaliação da eficácia dos produtos hidratantes para a pele. Consequentemente, as propriedades da pele relacionadas à impedância são avaliadas atualmente porque permitem que a hidratação da pele seja registrada de forma não invasiva e rápida. Especialmente os valores de capacitância de alta frequência correlacionam-se diretamente com o teor de água determinado gravimetricamente (47).

As propriedades elétricas da pele dependem do conteúdo de água do estrato córneo da epiderme. O princípio da corneometria é baseado na diferença entre a constante dielétrica da água e outras substâncias medindo a capacitância de um dielétrico médio. Qualquer mudança na constante dielétrica subsequente à variação na hidratação da superfície da pele leva a uma capacitância calculada prejudicada de um capacitador. O corneometer® contém dois elétrodos com diferentes cargas elétricas que formam um campo eletromagnético que determina a dieletricidade do estrato córneo (48).

A TEWL é a quantidade de água condensada que se difunde através de uma área fixa do estrato córneo até a superfície da pele por unidade de tempo (49). A TEWL é a medida objetiva mais amplamente usada para avaliar a função de barreira da pele em indivíduos saudáveis, mas também em pacientes com doenças de pele associadas à disfunção da barreira da pele, como dermatite atópica. A TEWL como uma medida do status da barreira de água da pele foi validada em humanos e camundongos, correlacionando a TEWL com a perda absoluta de água determinada gravimetricamente (50). Além de medir a função de barreira de água, as medições de TEWL *in vivo* correlacionam-se consistentemente com a absorção percutânea de compostos aplicados topicamente (51).

Como tal, as medições de TEWL podem ser vistas como uma medida indireta da permeabilidade da pele (tanto de dentro para fora como de fora para dentro), que é uma função do estado da barreira da pele. Uma barreira de pele mais forte, caracterizada por corneócitos de superfície maiores, um número aumentado de camadas de corneócitos (comprimento do caminho aumentado através do estrato córneo) e/ou as matrizes lipídicas lamelares

intercorneócitos melhoradas estão ligadas a TEWL reduzido (52). A evaporação da água da pele é medida usando uma sonda que é colocada em contato com a superfície da pele e contém sensores que detetam mudanças na densidade do vapor de água. A TEWL pode ser medida usando um dispositivo de câmara aberta, câmara não ventilada ou câmara condensadora. É uma medida sensível que é afetada por propriedades do microclima circundante, como humidade ambiental, temperatura e fluxo de ar, e deve ser medida em condições controladas. A TEWL varia significativamente em diferentes locais anatómicos e também depende da atividade das glândulas sudoríparas, temperatura da pele e propriedades dos corneócitos (49).

1.6.4 Rugas da pele

A topografia da superfície da pele é um micro-relevo poligonal com sulcos e rugas que representam a organização tridimensional da epiderme, a derme e do tecido subcutâneo. Depende de características morfológicas como espessura da camada cornificada e conteúdo de colagénio, podendo ser considerada como um espelho do estado funcional da pele. Existem medidas diretas e indiretas da topografia da pele. Medidas diretas da topografia da pele são realizadas por biópsias da pele ou pelo método do cianoacrilato de *Marks and Pearse*. As medições *in vivo* da pele são influenciadas por pulsações, movimentos da respiração, movimentos musculares e irritações tácteis, bem como alterações na tensão da pele promovidas por alterações de temperatura e humidade, que podem levar a perturbações de parâmetros topografia da superfície. Portanto, vários métodos indiretos foram desenvolvidos usando réplicas de pele de material de silicone. Como a geração da amostra é simples, precisa e não afeta a função e estrutura da pele, os investigadores podem repetir as avaliações na mesma área (53). A réplica de silicone da pele traduz a espessura da mesma a qual pode ser avaliada usando luz para indicar a profundidade e a área das rugas. Imagens 3D da área também podem ser usadas (35).

Um desses sistemas é o PRIMOS 3D®, que fornece uma análise fácil, objetiva e reproduzível da topografia da pele. Com isso, são fornecidas importantes pré-condições para validações de produtos cosméticos e tratamentos. O PRIMOS 3D® é usado em todo o mundo por empresas de cosméticos, institutos de testes, departamentos de dermatologia e universidades, sendo cada vez mais as aplicações dermatológicas deste método de topografia 3D (três dimensões), a fim de diagnosticar alterações cutâneas (54). A medição é efetuada através da variável R_a , que é a média de todas as alturas e profundidades até o plano de referência, sendo uma medida para a análise de rugas. O valor R_a diminui com a menor profundidade das rugas, indicando que as rugas da pele melhoraram (55). De destacar que outros sistemas como o Visiometer® e o VisioFace SSA® utilizam os mesmos princípios (56).

2 Objetivos

- Realizar uma revisão da literatura dos estudos que avaliam os efeitos da suplementação isolada de colagénio nas características da pele envolvidas no envelhecimento cutâneo

3 Metodologia

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica, em livros e revistas da especialidade, sobre o tema: suplementação de colagénio e o seu impacto no envelhecimento cutâneo. As bases de dados analisadas foram a SCIELO, PUBMED, Science Direct e o Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal. A pesquisa bibliográfica foi efetuada em inglês e português, utilizando as palavras-chave e combinações das mesmas: Colagénio; Colagénio Hidrolisado; Peptídios de colagénio; Suplementação; Suplementos; Pele; Envelhecimento Cutâneo; Envelhecimento Pele. O período de pesquisa foram os últimos 20 anos. O principal critério de inclusão foram os ensaios clínicos randomizados, duplamente cegos, com grupo de controlo, e $n \geq 10$ que avaliassem o efeito do colagénio em estudos *in vivo*, em humanos saudáveis, para demonstrar os efeitos da ingestão desse suplemento nas características da pele. Os critérios de exclusão foram estudos de caso, estudos *in vitro*, estudos em humanos não saudáveis ou a recuperar de lesões cutâneas, teses, publicações em congressos e estudos em animais.

4 Resultados

Neste capítulo encontram-se descritos os ensaios clínicos que fizeram recurso à suplementação de CH ou PC, selecionados com base nos critérios metodológicos deste trabalho. Um resumo, características e metodologias dos ensaios clínicos estão presentes na tabela 3.

Asserin, Lati (57) efetuaram dois ensaios clínicos controlados por placebo, onde avaliaram o efeito de um suplemento oral diário de PC em marcadores objetivos da aparência da pele. No primeiro ensaio, 33 mulheres japonesas, com idades entre os 40 e os 59 anos, consumiram 10g de placebo (maltodextrina), 10 g de peptídeo de colagénio derivado de suíno ou 10 g de peptídeo de colagénio derivado de peixe por 8 semanas (ou seja, 11 mulheres em cada grupo). Dois parâmetros relativos à quantidade de água da pele facial (hidratação e TEWL) foram avaliados no início do estudo e após 4 e 8 semanas de tratamento. Em comparação com os dados iniciais, um aumento significativo ($p < 0.01$) em relação à hidratação da pele foi observado em ambos os grupos de intervenção, enquanto não houve alteração no grupo de placebo. No entanto, apenas o suplemento de colagénio derivado de suíno mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na hidratação da pele quando comparado com o placebo. Com relação ao TEWL, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos de peptídeo

de colagénio e o placebo. No segundo ensaio clínico, 106 mulheres francesas com idades entre os 40 e os 65 anos foram distribuídas aleatoriamente para tomar diariamente uma bebida em pó, que continha 10 g de placebo (maltodextrina) ou 10 g de peptídeos de colagénio derivados de peixe, por 12 semanas consecutivas. A densidade de colagénio da derme foi avaliada por uma única medição. Após 12 semanas de tratamento, a densidade de colagénio na derme foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo de peptídeo de colagénio do que no grupo de placebo (aumento de 8,8% vs. nenhuma alteração). No mesmo estudo clínico os investigadores avaliaram o grau de fragmentação das fibras de colagénio na derme reticular por meio da RCM por Vivascope®. Apenas um indivíduo de cada grupo foi avaliado no início do estudo e 12 semanas após a ingestão oral de placebo ou PC, respetivamente. Às 12 semanas, a epiderme do sujeito que recebeu placebo exibia claramente estruturas de colagénio menores do que a linha de base, e em contraste, o sujeito que tomou PC apresentou fragmentos de colagénio maiores após 12 semanas de ingestão, reduzindo a fragmentação em 31,2%, em 12 semanas em comparação com o início do estudo. Assim, as fibras de colagénio foram menos fragmentadas após a ingestão de PC em comparação com o placebo. Segundo os investigadores, o resultado apresentado é interessante, mas devido ao reduzido número de participantes na avaliação deste parâmetro, a relevância desse achado é limitada.

Num ensaio clínico duplo-cego, randomizado com grupo de controlo de 69 mulheres de Proksch, Segger (5) que tinham entre os 35 e os 55 anos, foram colocados aleatoriamente num de três grupos: 2,5 g de CH, 5,0 g de CH, e 2,5 g de placebo (maltodextrina). Os suplementos (provenientes de porco) foram tomados diariamente durante 8 semanas, existindo avaliação antes da introdução do suplemento, 4 e 8 semanas após o início e 4 semanas depois do término da suplementação (apenas para medição da elasticidade da pele). De destacar que os investigadores tomaram diversas medidas para garantir a redução de viés no presente estudo, destacando-se que antes do início do tratamento oral e aquisição de dados, havia um período de pré-condicionamento de pelo menos 7 dias. Nesse período e durante todo o período do estudo, os indivíduos tiveram que evitar o uso de quaisquer produtos de limpeza de pele ou hidratantes nos braços e na área ao redor dos olhos. Além disso, foi proibido o uso de maquilhagem, lenços de limpeza, toalhetes para desmaquilhar e loção de limpeza nos locais de teste. Também foi proibido expor intensamente os locais de teste à luz UV (sol ou solário). Os indivíduos não foram autorizados a frequentar saunas ou piscinas e praticar desportos intensivos durante o dia anterior ao das avaliações. Além disso, eles foram proibidos de mudar os seus hábitos de vida ou dietéticos e de consumir qualquer suplemento nutricional ou preparações vitamínicas adicionais 4 semanas antes do início do estudo e durante o estudo. No

final do estudo, ambos os grupos de CH tiveram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na elasticidade da pele do rosto (com recurso a um Cutometer® MPA 580) em comparação com os grupos placebo, não existindo diferenças entre os grupos com doses diferentes de CH. Após 4 semanas de tratamento, um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na elasticidade da pele do antebraço foi observado nas mulheres mais velhas. Este estudo também observou correlações positivas entre o tratamento com CH e a hidratação (recorrendo a um Corneometer® CM825) e evaporação da pele (avaliando TEWL com recurso da instrumentação Dermalab®) nas mulheres com mais de 50 anos. No entanto, não foram estatisticamente significativas. Em relação à textura da pele (fazendo recurso de um sistema de captação ótico 3-dimensional de medição *in vivo* (PRIMUS Compact®) não existiram diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

Os mesmos autores conduziram um estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo em 114 mulheres com idades entre os 45 e os 65 anos, para avaliar objetivamente o impacto de um suplemento com 2,5g PC no volume das rugas oculares, após 8 semanas de ingestão diária. O volume das rugas oculares foi medido no canto externo do olho “pés de galinha”, usando um instrumento de medição 3D ótico *in vivo*, antes da intervenção, após 4 semanas, após 8 semanas e ainda 4 semanas após o término da intervenção. O grupo de investigadores teve os mesmos cuidados descritos no estudo anterior, de forma a evitar viés nos resultados. No final do estudo, a redução do volume das rugas no grupo PC foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), reduzindo 20,1% em média, quando comparado com o grupo placebo, fazendo recurso de um sistema de captação ótico 3-dimensional de medição *in vivo* (PRIMUS Compact). O impacto do tratamento com PC nas proteínas dérmicas na matriz extracelular (biomarcadores relacionados ao envelhecimento cutâneo) também foi investigado usando fluidos proveniente da sucção de bolha em 40 das mulheres (20 de cada grupo). Foi relatado um aumento estatisticamente significativo de colagénio ($p < 0,01$) e elastina ($p < 0,01$), mas não fibrilina, no grupo de tratamento com PC em comparação com o controlo. Os autores sugeriram que o efeito benéfico relatado nas rugas pode ser causado por um impacto direto desses peptídeos de colagénio na matriz extracelular dérmica (58).

Sugihara, Inoue (59) conduziram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por grupo controlo, para comparar os efeitos clínicos do CH composto pelos dipeptídeos, prolina-hidroxiprolina e hidroxiprolina-glicina. Foram selecionadas 85 mulheres chinesas, entre os 35 e os 55 anos de idade, efetuando uma distribuição em um de três grupos: maior conteúdo dos peptídeos de colagénio (H-PC) 5g (> 1 g de dipeptídeos por kg de suplemento), menor conteúdo dos peptídeos de colagénio (L-PC) 5g ($< 0,01$ g de dipeptídeos por kg de suplemento)

e 5 g placebo (maltodextrina). Foram submetidas à administração diária durante 8 semanas. Os resultados mostraram hidratação da pele significativamente maior ($p < 0,05$) na bochecha e no canto do olho em ambos os grupos de tratamento em comparação com o placebo. Quando comparamos os grupos de intervenção, verificamos que o grupo H-PC uma melhoria estatisticamente significativa ($p < 0,05$) maior do que o grupo L-PC e nas medições de hidratação da pele, elasticidade, rugas e textura da pele. O mesmo resultado verificou-se quando comparamos o grupo H-PC com o grupo placebo, apresentando também uma melhoria estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Inoue, Sugihara (60) efetuaram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com 56 mulheres de idades entre os 30 e os 55 anos, cujo objetivo era investigar a eficácia da ingestão diária de um hidrolisado de CH que continha prolina-hidroxiprolina (Pro-Hyp) e hidroxiprolina- glicina (Hyp-Gly), nas propriedades da pele da face. Neste ensaio, as mulheres foram randomizadas para receber 2,5 g de CH (proveniente de peixe) ou 5 g de placebo (maltodextrina) uma vez por dia, após o jantar, durante 8 semanas, com 28 indivíduos distribuídos para cada grupo. As propriedades da hidratação cutânea, elasticidade e textura da pele facial foram medidas na semana 0 (sem intervenção), 4 e 8. Os resultados de hidratação, elasticidade e textura da pele em indivíduos que receberam CH apresentaram uma melhoria estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre a semana 0 e as semanas 4 e 8. Além disso, os níveis de elasticidade da pele, textura e hidratação da pele melhoraram significativamente ($p < 0,01$) no grupo CH em comparação com o grupo placebo nas semanas 4 e 8. De destacar que no grupo placebo existiu uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na elasticidade da pele.

Koizumi, Inoue (61) efetuaram um ensaio clínico com o objetivo de examinar os efeitos dos PC obtidos de escamas de peixe nas rugas periorbitais, hidratação e elasticidade da pele, em mulheres saudáveis com idade entre os 30 e os 60 anos. O ensaio clínico realizado foi randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, onde 39 mulheres consumiram uma bebida de 20 ml contendo 3.000 mg de PC e outras 38 mulheres consumiram uma bebida placebo (sem PC mas com cor e odor semelhantes), uma vez por dia durante 12 semanas. No grupo placebo 4 pessoas desistiram durante o estudo e no grupo de intervenção 2 pessoas também desistiram, sendo todas as desistências justificadas por motivos pessoais. É interessante destacar que o grupo de investigadores procedeu à lavagem facial de todos os participantes, colocando-os posteriormente numa sala de espera durante 30 minutos com temperatura constante entre 20º-24º celsius e humidade relativa entre 40-60%, antes de efetuarem todas as medições na pele. Diminuições significativas nas rugas periorbitais ($p < 0,05$) foram observadas no grupo de

tratamento após 12 semanas de ingestão de PC em comparação com o grupo de controle, analisando este parâmetro com o Skin-Visiometer SV700® e classificando de acordo com 5 parâmetros (R1: ruga normal da pele; R2: ruga máxima; R3: ruga média; R4: ruga suave; R5: ruga média aritmética). Este estudo também demonstrou uma tendência consistente de aumento da hidratação facial ($p < 0,001$) utilizando o Corneometer® CM825 e elasticidade da pele ($p < 0,001$) utilizando o Cutometer® MPA580, isto no grupo que ingeriu a bebida com PC. Os resultados apresentados na melhoria das rugas periorbitais, hidratação e elasticidade da pele, podem ser justificadas, segundo Koizumi, Inoue (61), pela grande concentração de hidroxiprolina, prolina e glicina presentes na bebida de PC provenientes das escamas de peixe.

Tabela 3 – Resumo, características e metodologias dos ensaios clínicos incluídos na presente revisão

Autor(es)/ Financiamento / Tipo de estudo	Grupo de Estudo	Sujeitos/Duração	Fonte Colagénio/ Forma/ Dose	Variáveis/Resultados	Conclusões/ Efeitos Secundários
Proksch, Schunck (58)/ Brasil, comercial/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Intervenção: PC (VERISOL®) (n=57) Placebo: maltodextrina (n=57)	Mulheres saudáveis (45-65 anos) / 8 semanas	NR/ hidrolisado / 2,5 g por dia	<ul style="list-style-type: none"> Rugas da pele (PRIMOS Compact®) - ↓ comparado ao grupo placebo ($p < 0,01$) FC procologénio tipo I - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,01$) FC elastina - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,01$) FC fibrilina – SAES 	A ingestão oral de peptídeos de colagénio bioativos específicos reduziu as rugas da pele e teve efeitos positivos na síntese da matriz dérmica / Nenhum efeito adverso foi observado
Proksch, Segger (5)/ Brasil, comercial/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Intervenção: PC 2,5g (VERISOL®) (n=23) Intervenção: PC 5g (VERISOL®) (n=23) Placebo: maltodextrina 2.5g (n=23)	Mulheres saudáveis (35-55 anos) / 8 semanas	Suíno tipo 1 / hidrolisado / 2,5 g ou 5g	<ul style="list-style-type: none"> Elasticidade da pele (Cutometer® MPA 580) - ↑ em comparação com o controlo ($p < 0,05$) . Não existiu diferenças entre os grupos de intervenção Hidratação da pele (Corneometer® CM 825) – não existiu diferenças entre os grupos TEWL (TEWL DermaLab®) – não existiu diferenças entre os grupos Rugas da pele (PRIMOS Compact®) – não existiu diferenças entre os grupos 	A ingestão oral de CH específico levou a um aumento estatisticamente significativo da elasticidade da pele. Além disso, foi possível observar efeito hidratante da pele em mulheres idosas (≥50 anos), embora os resultados não tenham atingido nível de significância estatística / Nenhum efeito adverso foi observado
Asserin, Lati (57)/ Japão e França, comercial/ Duplo-Cego; Grupo placebo	Grupo PC Peptan F: (n=11) Grupo PC Peptan P: (n=11) Grupo placebo: dextrina (n=11)	Mulheres saudáveis (40-59 anos) / 56 dias	Peixe/ Suíno / hidrolisado / 10g	<ul style="list-style-type: none"> Hidratação da pele (Corneometer®) – ↑ em comparação com o controlo ($p < 0,01$) TEWL (Tewameter®) - não existiu diferenças entre os grupos 	A ingestão oral de peptídeos de colagénio de bioativos de suíno e peixe aumentou a hidratação da pele / Nenhum efeito adverso foi observado
Asserin, Lati (57)/ Japão e França, comercial/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Grupo PC Peptan F: (n=54) Grupo placebo: maltodextrina (n=54)	Mulheres saudáveis (40-65 anos) / 84 dias	Peixe/ hidrolisado / 10g	<ul style="list-style-type: none"> Densidade de colagénio da derme (ultrasom Dermcup®) – ↑ em comparação com o controlo ($p < 0,01$) Fragmentação do colagénio na derme reticular (microscópio Vivascope 3000®) – ↓ em comparação com o controlo (menos 31,2%) 	A ingestão oral de peptídeos de colagénio bioativos de peixe aumentou significativamente a densidade do colagénio na derme e a fragmentação da rede de colagénio dérmico diminuiu significativamente após 4 semanas de suplementação. Ambos os efeitos persistiram após 12 semanas / Nenhum efeito adverso foi observado
Sugihara, Inoue (59)/China, não reportado/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Intervenção: CH (n = 28) Placebo: maltodextrina (n = 28)	Mulheres saudáveis / 8 semanas	Peixe / hidrolisado / 2,5 g por dia	<ul style="list-style-type: none"> Hidratação da pele da face (Corneometer® CM820) - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,01$) Elasticidade facial (Cutometer® SEM 575) - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,01$) 	A ingestão diária de 2,5 g de CH melhora a hidratação, elasticidade e textura da pele facial / Não relatado

				<ul style="list-style-type: none"> • Textura da pele facial (VisioFace SSA®) - ↓ irregularidade na pele em comparado ao grupo placebo ($p < 0,05$) 	
Inoue, Sugihara (60)/ China, não reportado/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Intervenção 1: H-CH (n=28) Intervenção 2: L- CH (n=29) Placebo: maltodextrina (n=28)	Mulheres saudáveis / 8 semanas	Gelatina de peixe hidrolisada/ 5g; H-CH (> 1 g de dipeptídeos por kg de suplemento); L- CH (<0,01 g de dipeptídeos por kg de suplemento)	<ul style="list-style-type: none"> • Hidratação da pele da face (Corneometer® CM820) - ↑ no grupo H-PC em comparação com L-PC e placebo ($p < 0,05$) ; ↑ no grupo L-PC em comparação com o placebo ($p < 0,05$) • Elasticidade facial (Cutometer® SEM 575) - ↑ no grupo H-PC em comparação com L-PC e placebo ($p < 0,05$) • Textura da pele da face (VisioFace SSA®) - ↓ no grupo H-PC em comparação com L-PC e placebo ($p < 0,01$) • Rugas faciais (VisioFace SSA®) - ↓ no grupo H-CH em comparação com L-CH e placebo ($p < 0,01$) ; ↓ no grupo L-CH em comparação com o placebo ($p < 0,05$) 	O hidrolisado de colagénio com maior teor de Pro-Hyp e Hyp-Gly levou a mais melhorias nas condições da pele facial, incluindo hidratação, elasticidade, rugas e textura da pele facial. / Nenhum efeito adverso foi observado
Koizumi, Inoue (61)/ Japão, comercial/ Duplo-Cego; Randomizado; Grupo placebo	Intervenção: bebida contendo PC (n=39) Placebo: bebida sem PC (n=38)	Mulheres saudáveis (30-60 anos) / 12 semanas	Peixe (Escamas) / hidrolisado / 3 g	<ul style="list-style-type: none"> • Hidratação da pele da face (Corneometer® CM825) - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,05$) • Elasticidade da pele (Cutometer® MPA580) - ↑ comparado ao grupo placebo ($p < 0,05$) • Rugas periorbitais Visiometer SV700®) - ↓ comparado ao grupo placebo ($p < 0,05$) 	Os PC provenientes de escamas de peixe é uma grande promessa como um suplemento natural com propriedades antienvhecimento cutâneas. / Nenhum efeito adverso foi observado

CH (colagénio hidrolisado); FC (fluido corporal); H-PC (colagénio hidrolisado contendo grande quantidade de peptídeos de baixo peso molecular); L-PC (Colagénio hidrolisado contendo baixa quantidade de peptídeos de baixo peso molecular); NR (não reportado); PC (peptídios de colagénio); SAES (sem alteração estatisticamente significativa)

5 Discussão de resultados

Talvez uma das áreas mais debatidas no envelhecimento cutâneo é a eficácia dos suplementos de colagénio consumidos por via oral possuírem efeitos no envelhecimento da pele (35). Podemos referir que um dos principais problemas nesta temática é a ausência, na atualidade, de um grande número de estudos de qualidade que possam evidenciar de forma robusta os efeitos do colagénio no envelhecimento cutâneo (5). Poucas revisões existem sobre a relação entre a suplementação de colagénio e a sua influência na pele, mas as que existem (23, 62), possuem fatores passíveis de serem questionados, principalmente a nível metodológico na seleção de ensaios clínicos, uma vez que incluem estudos com suplementos que contêm, para além do colagénio, vitaminas, minerais e concentrados alimentares, incluem indivíduos com doenças cutâneas e em alguns casos em processos de recuperação de lesões da pele, o que pode criar viés nos resultados. É o caso da suplementação de vitamina C, que possui evidências na influência da síntese de colagénio cutâneo e melhoria das características associados ao envelhecimento da pele (63-66) e que ao fazer parte de um suplemento de colagénio pode influenciar diretamente a magnitude do resultado obtido.

Seis ensaios clínicos em humanos foram selecionados para a presente revisão, com suplementação de CH e PC com doses entre 2,5g/dia a 10g /dia e duração entre 8 a 12 semana e todos apresentam boas práticas ao nível da metodologia, sendo quase todos randomizados (com a exceção do primeiro ensaio clínico de Asserin, Lati (57)), duplo-cegos com grupos de controlo (5, 57-61). Verifica-se também que os métodos utilizados para avaliar os efeitos da suplementação de colagénio, estão validados e são amplamente utilizados em estudos que avaliam os efeitos de suplementos, tratamentos ou produtos cosméticos na qualidade da pele (67), embora não sejam os mesmos entre os diversos ensaios clínicos, sendo difícil a agregação de dados em alguns parâmetros avaliados. Um fator relevante é que todos os ensaios clínicos impuseram um conjunto de restrições aos participantes que pudessem influenciar os resultados, como é o caso das alterações dos hábitos de vida dietéticos ou o consumo de algum suplemento alimentar antes e durante o estudo. De destacar que três estudos (5, 58, 59) utilizaram um protocolo pré-avaliação que incluía a lavagem da pele e estabilização durante 30 minutos no local de avaliação com condições de humidade e temperatura controladas.

Na tabela 4 encontram-se os resultados dos ensaios clínicos selecionados para fazerem parte da presente revisão.

Tabela 4 – Resultados dos ensaios clínicos incluídos na presente revisão (início e final da intervenção) comparando o(s) grupo(s) de intervenção com o grupo placebo e os métodos utilizados.

Parâmetro em avaliação	Com resultados Método Estudo	Sem resultados Método Estudo
Elasticidade da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoria da elasticidade ($p < 0,05$) Cutometer® Proksch, Segger (5) • Melhoria da elasticidade ($p < 0,01$) Cutometer® Sugihara, Inoue (59) • Melhoria da elasticidade ($p < 0,05$) Cutometer® Inoue, Sugihara (60) • Melhoria da elasticidade ($p < 0,05$) Cutometer® Koizumi, Inoue (61) 	
Estrutura da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de procologénio I ($p < 0,01$) e elastina ($p < 0,01$) Biópsia de sucção de bolha Proksch, Schunck (58) • Melhoria densidade colagénio ($p < 0,01$) Ultrason Dermcup® Asserin, Lati (57) • Menor fragmentação do colagénio (menos 31,2%) Vivascope 3000® Asserin, Lati (57) 	<ul style="list-style-type: none"> • Manutenção de fibrilina Biópsia de sucção de bolha Proksch, Schunck (58)
Hidratação da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoria da hidratação ($p < 0,01$) Corneometer® Asserin, Lati (57) • Melhoria da hidratação ($p < 0,01$) Corneometer® Sugihara, Inoue (59) • Melhoria da hidratação ($p < 0,05$) Corneometer® Inoue, Sugihara (60) • Melhoria da hidratação ($p < 0,05$) Corneometer® Koizumi, Inoue (61) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações Corneometer® Proksch, Segger (5) • Sem alterações TEWL* Dermalab® Proksch, Segger (5) • Sem alterações TEWL* Tewameter® Asserin, Lati (57)
Rugas/Textura da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição das rugas ($p < 0,01$) Primos Compact® Proksch, Schunck (58) • Diminuição das rugas ($p < 0,05$) VisioFace SSA® Inoue, Sugihara (60) • Diminuição das rugas da pele ($p < 0,05$) Visiometer SV700® Koizumi, Inoue (61) • Melhoria na textura da pele ($p < 0,01$) VisioFace SSA® Inoue, Sugihara (60) • Melhoria na textura da pele ($p < 0,05$) VisioFace SSA® Sugihara, Inoue (59) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações Primos Compact® Proksch, Segger (5)

* Perda de água transepidérmica

Ao analisar os ensaios clínicos selecionados, podemos verificar que quatro estudos (5, 59-61) avaliaram a elasticidade da pele com recurso do mesmo método e com a mesma instrumentação (cutometer®) e todos eles demonstraram melhorias estatisticamente significativas em relação ao placebo. Este resultado obtido é de elevada relevância uma vez que uma das principais características do envelhecimento cutâneo, é a redução da elasticidade da pele, assim podemos verificar que embora as fontes de colagénio, formulações, quantidade e tempo de estudo não sejam as mesmas, o método de avaliação utilizado e a instrumentação foram os mesmos, demonstrando um possível efeito na melhoria da elasticidade da pele proveniente da suplementação de CH ou PC. Resultados idênticos foram relatados em quatro ensaios clínicos em humanos, randomizados, duplo-cegos com grupo de controlo, que utilizaram suplementação de colagénio não exclusivo (com vitaminas, minerais e concentrados de alimentos) utilizando a mesma instrumentação de avaliação (3, 68-70). No entanto, Genovese, Corbo (12) realizaram um ensaio clínico semelhante, mas utilizando uma instrumentação de avaliação diferente (DermaLab® USB Elasticity Module), e não foram encontradas melhorias estatisticamente significativas na elasticidade da pele em comparação com o placebo.

No que diz respeito à estrutura da pele, três ensaios clínicos relataram melhorias estatisticamente significativas em relação ao placebo (5, 57). É de destacar que métodos diferentes foram utilizados para avaliar a estrutura da pele sendo dois métodos indiretos e um método direto (BSB), sendo este último avaliado no antebraço. Embora os resultados relatados sejam positivos, a comparação entre métodos não é possível devido às técnicas aplicadas avaliarem parâmetros diferentes. De destacar que nos fluidos corporais obtidos no método de BSB não existiu diferença no conteúdo de fibrilina. Possivelmente este resultado pode ser justificado devido à fibrilina ser uma glicoproteína de alto peso molecular (340 kDa), que constitui o principal componente estrutural das microfibrilas da matriz elástica extracelular, e devido ao facto de criar macroagregados com outras moléculas da pele que possam ser de difícil extração através do método BSB (71, 72). Outra questão que também deve de ser levantada é que nos estudos publicados com o intuito de avaliar a eficácia do método BSB na avaliação da síntese de colagénio, não apresentam a quantificação da fibrilina como fator a avaliar (73, 74). Com isto mais estudos relacionados com a eficácia do método BSB e a medição da fibrilina, devem de ser efetuados para que esta questão seja esclarecida. Ainda dentro do mesmo parâmetro de avaliação dois ensaios clínicos (59, 60) que utilizaram a mesma instrumentação (Visioface SSA®) encontraram uma melhoria estatisticamente significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) na avaliação da textura da pele. De destacar que Campos, Melo (68) encontraram resultados semelhantes no seu ensaio clínico em humanos,

randomizado duplo-cego com grupo de controlo, que utilizaram suplementação de colagénio não exclusivo (com vitaminas, minerais e concentrados de alimentos). Ainda o mesmo grupo de investigadores Campos, Melo (68) e Campos and Patricia (3) apresentando uma melhoria estatisticamente significativa na ecogenicidade da derme, recorrendo à mesma instrumentação Visioface SSA® uma característica importante na estrutura da pele, nos seus ensaios clínicos em humanos, randomizados, duplo-cegos com grupo de controlo, com recurso à suplementação de colagénio não exclusivo.

Em relação à hidratação da pele, quatro ensaios clínicos (57, 59-61) que utilizaram o mesmo método de avaliação, e a mesma instrumentação (neste caso o corneometer®), encontram melhorias estatisticamente significativas em relação ao placebo. Este resultado é extremamente relevante, uma vez que na pele jovem, a maior parte da água está ligada ao colagénio resultando em grande importância para as propriedades estruturais e mecânicas das proteínas e suas interações mútuas, no entanto, na pele envelhecida, a água é encontrada na forma de tetraedro apresento maior hidratação (75, 76). Em linha com estes resultados, os ensaios clínicos em humanos, randomizados, duplo-cegos com grupo de controlo, de Campos, Melo (68), Choi, Ko (69), Kim, Chung (70), avaliaram a suplementação de colagénio não exclusivo (com vitaminas, minerais e concentrados de alimentos) nos parâmetros da hidratação da pele com recurso à mesma instrumentação de avaliação (corneometer®), obtendo resultados de melhorias neste parâmetro estatisticamente significativos. Assim podemos verificar que embora as fontes de colagénio, formulações, quantidade e tempo de estudo não sejam as mesmas, o método de avaliação utilizado e a instrumentação foram os mesmos, demonstrado um possível efeito na melhoria da hidratação da pele proveniente da suplementação de CH e PC. Apenas o estudo de Proksch, Segger (5) não encontrou alterações neste parâmetro, embora numa análise dentro do grupo de intervenção uma melhoria entre 11-14% nas mulheres com mais de 50 anos, mas sem se conseguir com que os dados atingissem níveis de significância estatística. Resultados idênticos foram relatados pelo ensaio clínico com suplementação de colagénio não exclusivo de Campos and Patricia (3) Ainda dentro da hidratação da pele, verificou-se que não existiu alterações em dois estudos (5, 57) utilizando o método de TEWL embora com diferentes instrumentações. Choi, Ko (69) obteve resultados semelhantes com recurso a instrumentação idêntica (TEWL Tewameter® igual ao estudo de Asserin, Lati (57)) num ensaio clínico com a suplementação de colagénio não exclusivo. Uma possível justificação para este resultado é a difícil calibração desta instrumentação e a facilidade da mesma ser amplamente influenciada por questões de humidade e temperatura do local onde a avaliação é efetuada, como referido por Alexander, Brown (49).

Ao compilarmos os resultados relativos às rugas da pele, verifica-se que três estudos (58, 60, 61) obtiveram melhorias estatisticamente significativas em relação ao placebo. De relatar que embora o método de avaliação das rugas tenha sido o mesmo, neste caso instrumentações diferentes foram utilizadas. Em linha com estes resultados Kim, Chung (70) e Laing, Bielfeldt (77) obtiveram resultados idênticos em ensaios clínicos em humanos, randomizados, duplo-cegos com grupo de controlo com suplementação de colagénio não exclusivo. De referir que o estudo de Proksch, Segger (5) não encontrou alterações neste parâmetro. É curioso verificar que já anteriormente o mesmo estudo tinha sido o único a não encontrar alterações na hidratação da pele (com Corneometer® e TEWL Dermalab®). Ainda dentro de parâmetros de avaliação semelhantes, neste caso a textura da pele, verificou-se uma melhoria em dois estudos (59, 60) que utilizaram o mesmo método de avaliação e a mesma instrumentação. Assim sendo, podemos verificar que embora as fontes de colagénio, formulações, quantidade e tempo de estudo não sejam as mesmas, o método de avaliação utilizado e a instrumentação foram os mesmos, demonstrado um possível efeito na melhoria das rugas e textura da pele proveniente da suplementação de CH e PC.

Uma questão é levantada por Spiro and Lockyer (35) em relação aos suplementos de colagénio usados nos ensaios clínicos, pois utilizam fontes de colagénio diferentes, com doses diferentes, tomados durante períodos de tempo diferentes, não sendo comparáveis, o que pode levar a inconsistências ao agregar os dados. O mesmo autor refere que os ensaios clínicos são limitados também por envolver apenas pacientes de determinadas regiões geográficas, sexo e grupos de idade, embora possamos verificar que todos os ensaios clínicos selecionados nesta revisão incluíam com mais de 35 anos, onde os sinais do envelhecimento cutâneo começam a ser visíveis (78).

Alguns autores referem que as evidências dos efeitos da suplementação na pele são limitadas, uma vez que o colagénio não é mais eficaz em beneficiar a pele do que a ingestão adequada de proteínas na dieta, particularmente porque os aminoácidos, como lisina e prolina, necessários para a produção de colagénio são consumidos como parte das dietas diárias (35). O problema destas afirmações é que segundo Paul, Leser (79) as quantidades eficazes de peptídeos de colagénio (2,5 a 15 g por dia) observadas na literatura, não são atingidos na dieta americana padrão, sendo esta caracterizada por um consumo proteico acima da média. Outra questão é que todo o colagénio contém 19 aminoácidos diferentes, com um conteúdo particularmente alto de hidroxiprolina, glicina e prolina. A abundância de hidroxiprolina é notável pois este aminoácido não é encontrado noutras fontes proteicas. No entanto, o colagénio tem sido considerado uma proteína inferior por falta de triptofano, um dos nove aminoácidos essenciais (80).

6 Conclusões

A suplementação de colagénio tem a hipótese de promover a síntese de colagénio na pele. Com base no número limitado de estudos disponíveis, os resultados preliminares são promissores para o uso de suplementos orais de CH/PC no combate ao envelhecimento cutâneo. Dos resultados promissores da suplementação de CH/PC destaca-se o aumento da elasticidade e a hidratação da pele, a melhoria da estrutura da pele, diminuição das rugas e melhoria da textura da pele. Embora os fragmentos de colagénio não possam estar envolvidos diretamente na síntese de proteínas, estes podem afetar o metabolismo da matriz extracelular e podem ter um papel imunomodulador, diminuindo o ataque das células imunitárias às estruturas que possuem colagénio. Estudos adicionais precisam de ser conduzidos para elucidar ainda mais o papel da suplementação de colagénio, nas características da pele relacionadas com envelhecimento cutâneo, com amostras de maior dimensão, tempos de estudo mais prolongados, presença de ambos os sexos, mais variabilidade de origem geográfica dos participantes, com métodos de avaliação mais uniformes entre os vários estudos.

7 Limitações

É de destacar que a diminuta quantidade de ensaios clínicos relativos à temática em estudo, foi uma das maiores limitações na imposição de critérios de maior qualidade para seleção dos estudos da presente revisão.

8 Referências bibliográficas

1. Silva T, Pena A. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2012;71 (3):530-9.
2. Richelle M, Sabatier M, Steiling H, Williamson G. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Br J Nutr*. 2006;96(2):227-38.
3. Campos M, Patricia M. An Oral Supplementation Based on Hydrolyzed Collagen and Vitamins Improves Skin Elasticity and Dermis Echogenicity: A Clinical Placebo-Controlled Study. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*. 2015;04(03).
4. Jhawar N, Wang JV, Saedi N. Oral collagen supplementation for skin aging: A fad or the future? *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(4):910-2.
5. Proksch E, Segger D, Degwert J, Schunck M, Zague V, Oesser S. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(1):47-55.
6. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G-e, et al. Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(5):1218-24.
7. Avila Rodriguez MI, Rodriguez Barroso LG, Sanchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*. 2018;17(1):20-6.
8. Albornoz CA, Shah S, Murgia RD, Wang JV, Saedi N. Understanding aesthetic interest in oral collagen peptides: A 5-year national assessment. 2020;n/a(n/a).
9. Krutmann J, Boulouc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science*. 2017;85(3):152-61.
10. Yazaki M, Ito Y, Yamada M, Goulas S, Teramoto S, Nakaya MA, et al. Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. *J Agric Food Chem*. 2017;65(11):2315-22.
11. Krutmann J, Humbert P. Nutrition for healthy skin: Strategies for clinical and cosmetic practice. 2011. p. 1-208.
12. Genovese L, Corbo A, Sibilla S. An Insight into the Changes in Skin Texture and Properties following Dietary Intervention with a Nutricosmeceutical Containing a Blend of Collagen Bioactive Peptides and Antioxidants. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017;30(3):146-58.
13. Doshi DN, Hanneman KK, Cooper KD. Smoking and Skin Aging in Identical Twins. *Archives of Dermatology*. 2007;143(12):1543-6.
14. Koh JS, Kang H, Choi SW, Kim HO. Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas. 2002;41(1):21-7.
15. Vierkötter A, Schikowski T, Ranft U, Sugiri D, Matsui M, Krämer U, et al. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(12):2719-26.
16. Borumand M, Sibilla S. Daily consumption of the collagen supplement Pure Gold Collagen(R) reduces visible signs of aging. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1747-58.
17. Dunn JH, Koo J. Psychological Stress and skin aging: a review of possible mechanisms and potential therapies. *Dermatology online journal*. 2013;19(6):18561.

18. Gautieri A, Passini FS, Silvan U, Guizar-Sicairos M, Carimati G, Volpi P, et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol.* 2017;59:95-108.
19. Leon-Lopez A, Morales-Penaloza A, Martinez-Juarez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Alvarez G. Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. *Molecules.* 2019;24(22).
20. Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry: Fourth edition.* New York : W.H. Freeman, 2005.; 2005.
21. Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica médica.* ed. a, editor 2011.
22. Salwowska NM, Bebenek KA, Źądło DA, Wcisło-Dziadecka DL. Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *J Cosmet Dermatol.* 2016;15(4):520-6.
23. Barati M, Jabbari M, Navekar R, Farahmand F, Zeinalian R, Salehi-Sahlabadi A, et al. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(11):2820-9.
24. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry.* 2010;79:351-79.
25. Madsen DH, Leonard D, Masedunskas A, Moyer A, Jürgensen HJ, Peters DE, et al. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J Cell Biol.* 2013;202(6):951-66.
26. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology.* 2012;5(3):232-9.
27. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55(2):107-17.
28. Switzar L, Giera M, Niessen WM. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research.* 2013;12(3):1067-77.
29. Nishikimi A, Koyama YI, Ishihara S, Kobayashi S, Tometsuka C, Kusubata M, et al. Collagen-derived peptides modulate CD4(+) T-cell differentiation and suppress allergic responses in mice. *Immunity, inflammation and disease.* 2018;6(2):245-55.
30. Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. In: Manole B, editor. 2005. p. 878.
31. Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, Budh-Raja A, Genovese L. An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *The Open Nutraceuticals Journal.* 2015;8:29-42.
32. Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem.* 2010;58(2):835-41.
33. Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2005;53(16):6531-6.
34. Barata EAF. *Cosméticos - A Cosmética, Inovações e Enquadramento Legal:* Lidel; 2018.
35. Spiro A, Lockyer S. Nutraceuticals and skin appearance: Is there any evidence to support this growing trend? *Nutrition Bulletin.* 2018;43(1):10-45.
36. Woo MS, Moon KJ, Jung HY, Park SR, Moon TK, Kim NS, et al. Comparison of skin elasticity test results from the Ballistometer® and Cutometer®. 2014;20(4):422-8.

37. Murray BC, Wickett RR. Correlations between Dermal Torque Meter®, Cutometer®, and Dermal Phase Meter® measurements of human skin. 1997;3(2):101-6.
38. Ahn S, Kim S, Lee H, Moon S, Chang I. Correlation between a Cutometer and quantitative evaluation using Moire topography in age-related skin elasticity. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*. 2007;13(3):280-4.
39. Barcaui EdO, Carvalho ACP, Lopes FPPL, Piñeiro-Maceira J, Barcaui CB. High frequency ultrasound with color Doppler in dermatology. *An Bras Dermatol*. 2016;91(3):262-73.
40. Naredo E, Pascau J, Damjanov N, Lepri G, Gordaliza PM, Janta I, et al. Performance of ultra-high-frequency ultrasound in the evaluation of skin involvement in systemic sclerosis: a preliminary report. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2020;59(7):1671-8.
41. Polańska A, Dańczak-Pazdrowska A, Jałowska M, Żaba R, Adamski Z. Current applications of high-frequency ultrasonography in dermatology. *Postepy Dermatol Alergol*. 2017;34(6):535-42.
42. Grant-Kels JM, Pellacani G, Longo C. Reflectance Confocal Microscopy Clinical Applications: The Skin from Inside. *Dermatologic Clinics*. 2016;34(4):xiii-xiv.
43. Holm LL, Vukmanovic-Stejic M, Blauenfeldt T, Benfield T, Andersen P, Akbar AN, et al. A Suction Blister Protocol to Study Human T-cell Recall Responses In Vivo. *J Vis Exp*. 2018(138):57554.
44. Hatje LK, Richter C, Blume-Peytavi U, Kottner J. Blistering time as a parameter for the strength of dermoepidermal adhesion: a systematic review and meta-analysis. *The British journal of dermatology*. 2015;172(2):323-30.
45. Panoutsopoulou I, Wendelschafer-Crabb G, Hodges J, Kennedy W. Skin blister and skin biopsy to quantify epidermal nerves A comparative study. *Neurology*. 2008;72:1205-10.
46. Agache P, Mary S, Muret P, Matta AM, Humbert P. Assessment of the Water Content of the Stratum corneum Using a Sorption-Desorption Test. *Dermatology*. 2001;202(4):308-13.
47. Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, et al. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *International journal of cosmetic science*. 2003;25:45-53.
48. Constantin M-M, Poenaru E, Poenaru C, Constantin T. Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies. *Maedica (Bucur)*. 2014;9(1):33-8.
49. Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. *The Journal of investigative dermatology*. 2018;138(11):2295-300.e1.
50. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Experimental dermatology*. 2006;15(7):483-92.
51. Levin J, Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of Controlled Release*. 2005;103(2):291-9.
52. Damien F, Boncheva M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(2):611-4.

53. Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P. Direct and non-direct measurement techniques for analysis of skin surface topography. *Skin pharmacology and applied skin physiology*. 1999;12(1-2):1-11.
54. Benderoth S, Hainich R, editors. *Optical 3D In-Vivo Skin Imaging for Topographical Quantitative Assessment of Cosmetic and Medical Treatments* 2010.
55. Hahn HJ, Jung HJ, Schrammek-Drusios MC, Lee SN, Kim JH, Kwon SB, et al. Instrumental evaluation of anti-aging effects of cosmetic formulations containing palmitoyl peptides, Silybum marianum seed oil, vitamin E and other functional ingredients on aged human skin. *Exp Ther Med*. 2016;12(2):1171-6.
56. Lee HK, Seo YK, Baek JH, Koh JS. Comparison between ultrasonography (Dermascan C version 3) and transparency profilometry (Skin Visiometer SV600). *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*. 2008;14(1):8-12.
57. Asserin J, Lati E, Shioya T, Prawitt J. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *J Cosmet Dermatol*. 2015;14(4):291-301.
58. Proksch E, Schunck M, Zague V, Segger D, Degwert J, Oesser S. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(3):113-9.
59. Sugihara F, Inoue N, Wang X. Clinical effects of ingesting collagen hydrolysate on facial skin properties: -A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Japanese Pharmacology and Therapeutics*. 2015;43:67-70.
60. Inoue N, Sugihara F, Wang X. Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study. *Journal of the science of food and agriculture*. 2016;96(12):4077-81.
61. Koizumi S, Inoue N, Shimizu M, Kwon C-j, Kim H-y, Park K. Effects of Dietary Supplementation with Fish Scales-Derived Collagen Peptides on Skin Parameters and Condition: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2017;24.
62. Choi FD, Sung CT, Juhasz ML, Mesinkovsk NA. Oral Collagen Supplementation: A Systematic Review of Dermatological Applications. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2019;18(1):9-16.
63. Hinek A, Kim HJ, Wang Y, Wang A, Mitts TF. Sodium L-ascorbate enhances elastic fibers deposition by fibroblasts from normal and pathologic human skin. *J Dermatol Sci*. 2014;75(3):173-82.
64. May JM, Harrison FE. Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(17):2068-83.
65. May JM, Qu ZC. Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005;434(1):178-86.
66. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*. 2017;9(8):866.

67. Bielfeldt S, Springmann G, Seise M, Wilhelm K-P, Callaghan T. An updated review of clinical methods in the assessment of ageing skin – New perspectives and evaluation for claims support. 2018;40(4):348-55.
68. Campos M, Melo MO, Siqueira Cesar FC. Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and density. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18(6):1693-9.
69. Choi SY, Ko EJ, Lee YH, Kim BG, Shin HJ, Seo DB, et al. Effects of collagen tripeptide supplement on skin properties: a prospective, randomized, controlled study. *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*. 2014;16(3):132-7.
70. Kim DU, Chung HC, Choi J, Sakai Y, Lee BY. Oral Intake of Low-Molecular-Weight Collagen Peptide Improves Hydration, Elasticity, and Wrinkling in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*. 2018;10(7).
71. Ramirez F, Sakai LY. Biogenesis and function of fibrillin assemblies. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):71-82.
72. Thomson J, Singh M, Eckersley A, Cain SA, Sherratt MJ, Baldock C. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Seminars in cell & developmental biology*. 2019;89:109-17.
73. Koivukangas V, Oikarinen A. Suction Blister Model of Wound Healing. In: DiPietro LA, Burns AL, editors. *Wound Healing: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 255-61.
74. Autio P, Oikarinen A. Suction blister techniques for measurement of human skin collagen synthesis. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*. 1997;3(2):88-94.
75. Mojumdar EH, Pham QD, Topgaard D, Sparr E. Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific reports*. 2017;7(1):15712.
76. Aguirre-Cruz G, León-López A, Cruz-Gómez V, Jiménez-Alvarado R, Aguirre-Álvarez G. Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020;9(2).
77. Laing S, Bielfeldt S, Ehrenberg C, Wilhelm KP. A Dermonutrient Containing Special Collagen Peptides Improves Skin Structure and Function: A Randomized, Placebo-Controlled, Triple-Blind Trial Using Confocal Laser Scanning Microscopy on the Cosmetic Effects and Tolerance of a Drinkable Collagen Supplement. *Journal of medicinal food*. 2020;23(2):147-52.
78. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(1):5-10.
79. Paul C, Leser S, Oesser S. Significant Amounts of Functional Collagen Peptides Can Be Incorporated in the Diet While Maintaining Indispensable Amino Acid Balance. *Nutrients*. 2019;11(5).
80. Gauza-Włodarczyk M, Kubisz L, Włodarczyk D. Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. *International journal of biological macromolecules*. 2017;104(Pt A):987-91.

